

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年2月19日 (19.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/015100 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/00, 15/12, 15/19, C12Q 1/02,  
1/66, 1/68, A61K 45/00, 39/395, A61P 9/10, 29/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010131

(22) 国際出願日: 2003年8月8日 (08.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-231532 2002年8月8日 (08.08.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 理化学  
研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広  
沢2番1号 Saitama (JP).

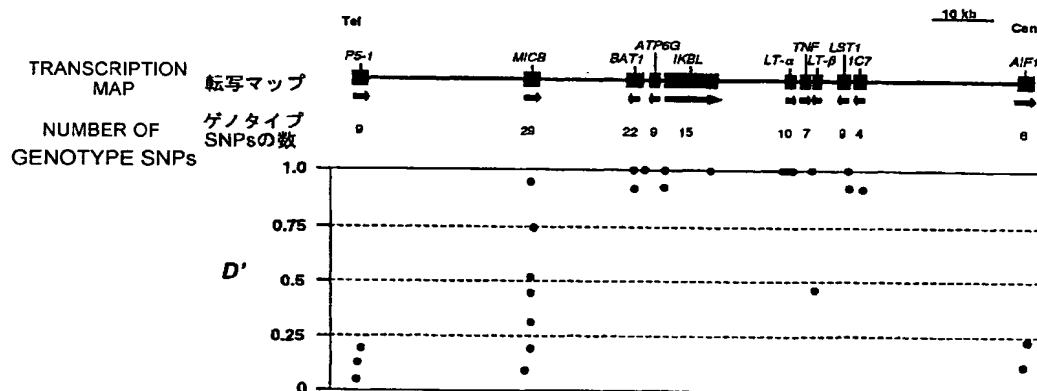
(71) 出願人 および

(72) 発明者 (日本, 米国についてのみ): 田中 敏博  
(TANAKA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒153-0062 東京都目  
黒区三田1-5-6-801 Tokyo (JP). 大西洋三  
(OHNISHI, Yozo) [JP/JP]; 〒152-0023 東京都目黒  
区八雲3-29-13-2号 Tokyo (JP). 尾崎 浩一  
(OZAKI, Koichi) [JP/JP]; 〒150-0013 東京都渋谷区  
恵比寿3-36-13-307 Tokyo (JP). 飯田 有  
俊 (IIDA, Aritoshi) [JP/JP]; 〒211-0014 神奈川県川  
崎市中原区田尻町21 Kanagawa (JP). 堀 正二  
(HORI, Masatsugu) [JP/JP]; 〒565-0871 大阪府吹田  
市山田丘2-2 大阪大学大学院病態情報内科学内  
Osaka (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF JUDGING INFLAMMATORY DISEASE

(54) 発明の名称: 炎症性疾患の判定方法



(57) **Abstract:** It is intended to provide a method of judging an inflammatory disease such as myocardial infarction by identifying single nucleotide polymorphisms (SNPs) relating to myocardial infarction and using these SNPs. Namely, a method of judging an inflammatory disease which comprises detecting at least one gene polymorphism occurring in at least one gene selected from the group consisting of lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) gene, I Kappa B-like (IKBL) gene and BAT1 gene; an oligonucleotide to be used in this method; a kit for diagnosing an inflammatory disease which contains the oligonucleotide; and utilization thereof. Also, a method of treating an inflammatory disease and a method of screening a remedy for an inflammatory disease with the use of LT- $\alpha$  are provided.

(57) **要約:** 本発明の目的は、心筋梗塞と関連性のある一塩基多型 (SNPs) を同定し、これらの SNPs を利用して心筋梗塞をはじめとする炎症性疾患を判定するである。本発明によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用が提供される。

[続葉有]



(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 祐輔 (NAKA-MURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒225-0011 神奈川県 横浜市 青葉区 あざみ野 1-17-33 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,

SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 炎症性疾患の判定方法

## 技術分野

本発明はLT- $\alpha$ 遺伝子等に存在する遺伝子多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法、該方法に使用されるオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含む炎症性疾患診断用キット、並びにそれらの利用に関する。本発明はさらに、LT- $\alpha$ を利用した、炎症性疾患の治療方法及び炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法にも関する。

## 背景技術

ライフスタイルの変化及び新しい薬理学的アプローチにも関わらず、心筋梗塞を含む冠状動脈疾患は多くの国々において主要な死亡原因となっている(Breslow, J. L., Nature Med. 3, 600-601, 1997; Braunwald, E., N. Engl. J. Med., 337, 1360-1369, 1997)。従って、それらの発症における遺伝的及び環境的因子を同定することが強く望まれている。

共通の遺伝的変異は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病に罹患する危険性と顕著に関連していることが知られている(Risch, N., et al., Science, 273, 1516-1517, 1996; Collins, F. S., et al., Science, 278, 1580-1581, 1997; Lander, E. S., et al., Science, 274, 536-539, 1996)。多遺伝子性疾患の感受性遺伝子を同定するには、「連鎖」を利用する方法と、「関連」を利用する方法がある。連鎖解析では、疾患感受性遺伝子の座位と遺伝マーカー（主としてマイクロサテライト）の座位が連鎖しているかを検出する、すなわち遺伝子座位間の関係を調べるのに対して、関連解析では特定の遺伝マーカー（主として一塩基多型：SNP）のどの型（アレル：対立遺伝子）が疾患と関連しているかを検出する、つまり対立遺伝子間の関係を調べる。従って、共通の変異をマーカーとして用いる関連解析は疾患関連遺伝子の局在に対する連鎖解析のよりもずっと強力といえる。一塩

基多型 (SNPs) は、疾患易罹患性や薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多型マーカーとなる。SNPs は、遺伝子産物の質や量に直接影響を与えたり、ある疾患や薬剤による重篤な副作用に対する危険性を増やすことがある。よって、多くの SNPs を探索することにより、疾患関連遺伝子の同定や薬剤による副作用を避ける診断方法の確立に寄与できることを期待される。

ヒト染色体 6 p 21 上の約 130 kb の領域には、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ )、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、LST1、1C7、アログラフト炎症因子-1 (AIF-1: allograft inflammatory-factor-1)、I kappa B-like protein (IKBL)、V-ATPase G-subunit like protein (ATP6G)、BAT1、MICB 及び p5-1 が存在している。LT- $\alpha$  (TNF- $\beta$  としても知られる) は血管炎症過程の最初の段階に生産されるサイトカインの一つで、 $\beta$  シート構造がサンドイッチ状に重なったホモトリマー構造をとり、インターロイキン-1 及び接着分子のような他のメディエーターを誘導することによってサイトカインカスケードを活性する (Ross, R., N. Engl. J. Med., 340, 115-126, 1999)。サイトカインのような炎症メディエーターは、アテローム形成やアテローム性損傷に関与し、管腔内血栓を誘導することが知られている (Ross, R., N. Engl. J. Med., 340, 115-126, 1999)。IKBL は主要組織親和性複合体 (NHC) クラス II 領域において 6 p 21.3 に位置している。IKBL は B 細胞における  $\kappa$  軽鎖遺伝子のインヒビター (IKB) ファミリータンパク質に類似していると報告されている。IKB ファミリーのタンパク質は B 細胞内における  $\kappa$  軽鎖遺伝子エンハンサーの核因子を阻害する作用を有する。

遺伝子変異と心筋梗塞との関係については、これまでヒトプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の多型を分析して心筋梗塞の遺伝的要因を判定する方法 (特開 2002-136291 号公報) などがある。しかしながら、上記の 6 p 21 上の約 130 kb の領域に存在する遺伝子変異と心筋梗塞との関連についてはこれまで報告はない。

## 発明の開示

本発明の課題は、心筋梗塞と関連性のある遺伝子多型を同定し、その遺伝子多型を利用して心筋梗塞をはじめとする炎症性疾患を判定する方法、該方法に用いることのできるオリゴヌクレオチド、炎症性疾患診断用キット、並びに炎症性疾患の治療方法などを提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべくヒトLT- $\alpha$ 、IKBL、及びBAT1遺伝子内のSNPsをそれぞれ約1,000人の心筋梗塞患者群と対照群についてマルチプレックスPCR-インベータ法によりタイピングし、患者-対照研究(case-control study)による関連解析を行った結果、これらのSNPsの頻度が統計学的に有意に心筋梗塞患者で多いことを同定した。さらに、ルシフェラーゼアッセイ法、リコンビナントプロテインを用いた実験により、これらのSNPsが該遺伝子の転写活性に影響を与え、その結果遺伝子産物量が変化し、この変化が心筋梗塞等の疾患を引き起こす可能性を見出した。本発明はかかる知見により完成されたものである。

すなわち、本発明によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、IKBL-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

すなわち、本発明によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、IKBL-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

本発明によればまた、下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

(1) 配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

本発明によればまた、配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 80 番目から 82 番目の塩基の少なくとも一つが他の塩基に置換されることによって、コードされるアミノ酸がスレオニンからアスパラギンに変異する遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法が提供される。

本発明によればまた、配列番号 1 から 5 に示される配列における、前記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、前記判定方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

(1) 配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位

(2) 配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目部位

(3) 配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の部位

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の部位

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の部位

本発明によればまた、配列番号 1 から 5 に示される配列における、前記の (1)

から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも１つの部位を含む連続する少なくとも１０塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、前記判定方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチドが提供される。

（１） 配列番号１に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン１の塩基配列の１０番目の部位

（２） 配列番号２に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン１の塩基配列の９０番目部位

（３） 配列番号３に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン３の塩基配列の８１番目の部位

（４） 配列番号４に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の５７２番目の部位

（５） 配列番号５に示すBAT１遺伝子のプロモーターの塩基配列の１２２８番目の部位

さらに、本発明によれば、上記のオリゴヌクレチドの１種以上を含む、炎症性疾患診断用キットが提供される。

本発明の別の側面によれば、前記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT１の発現状態の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT１遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT１の転写活性の測定方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記の（１）から（５）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT１遺伝子断片を細胞に導入し、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT１の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT１の転写活性阻害物質のスクリーニング方法が提

供される。

本発明の好ましい態様によれば、前記LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する、上記いずれかの方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、LT- $\alpha$ の転写制御因子のスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるC/Aの多型を含む遺伝子断片を接着分子誘導性細胞に導入し、該細胞の接着分子の誘導化能を評価する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ )の発現又は活性を抑制することを含む、炎症性疾患の治療方法が提供される。好ましくは、炎症性疾患は心筋梗塞である。上記方法において好ましくは、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ )に対する抗体を用いる。

本発明のさらに別の側面によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ )の発現又は活性を抑制する物質を有効成分として含む、炎症性疾患の治療薬が提供される。好ましくは、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ )の発現又は活性を抑制する物質は、リンホトキシン- $\alpha$ に対する抗体である。

本発明のさらに別の側面によれば、細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内におけるリンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ )をコードする遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。



本発明のさらに別の側面によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) と候補物質とを接触させる工程、リンホトキシン- $\alpha$  の活性を測定する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較してリンホトキシン- $\alpha$  の活性を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、リンホトキシン- $\alpha$  の活性は、接着分子及び／又はサイトカインを誘導する活性である。好ましくは、接着分子は、VCAM-1、ICAM-1又はE-セレクトリンであり、サイトカインはTNFである。

本発明の一例によれば、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) の発現量又は活性の低下は、IKBL遺伝子の発現量又は活性の増加を介したものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、LT- $\alpha$  遺伝子座を含む130kbのゲノム領域における連鎖不平衡を示す。

上：各遺伝子におけるゲノタイプされたSNPsの数を表す転写マップ。

下：本領域におけるD'の分布。D'はLT- $\alpha$  のイントロン1内のSNP対他のSNPで示す。

図2(A)はLT- $\alpha$  のイントロン1(252A>G)、図2(B)はIKBLのプロモーター領域(-63T>A)内のSNPによる転写制御活性をそれぞれ示す。\*10G-252Aと10A-252Gとの間の比較において $p < 0.01$ ；\*\* -63Aアレルと-63Tアレル間の比較において $p < 0.01$  (student's t test)。

図3は、LT- $\alpha$  のイントロン1に対する未知の核因子の結合を示す。矢印は核因子のG-アレルに対するより強い結合を示すバンドである。

図4(A)は、HCASMCのみを培養した場合(白色バー)、HCASMCを26T-LT- $\alpha$  (灰色バー)又は26N-LT- $\alpha$  (黒色バー)(5ng/ml)を用いて4時間処理して培養した場合のVCAM-1の相対的なmRNA発現量をそれぞれ示す。図4(B)は、HCASMCのみを培養した場合(白色バー)、H

CASMCを26T-LT- $\alpha$  (灰色バー) 又は26N-LT- $\alpha$  (黒色バー) (5 ng/ml) を用いて4時間処理して培養した場合のE-セレクトインの相対的なmRNA発現量を示す。結果は平均値 $\pm$ S.D. (n=3、\*p<0.01、\*\*p<0.05 対26T)を示す。

図5は、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) におけるLT- $\alpha$  (26Asn) (26N) のTNF誘導活性及びSelectinE誘導活性 (相対的なmRNA発現量) について、LT- $\alpha$  (26Thr) (26T) の場合と比較した結果を示す。結果は平均値 $\pm$ S.D. (\*p<0.01、\*\*p<0.05 対26T)を示す。

図6は、血球系細胞株 (HL-60) におけるLT- $\alpha$  (26Asn) (26N) のTNF誘導活性及びICAM1誘導活性 (相対的なmRNA発現量) について、LT- $\alpha$  (26Thr) (26T) の場合と比較した結果を示す。結果は平均値 $\pm$ S.D. (\*p<0.01 対26T)を示す。

発明を実施するための最良の形態

#### [1] 炎症性疾患の判定方法

本発明の方法は、炎症性疾患と関連性を示す特定遺伝子に存在する遺伝子多型、特には一塩基多型 (SNPs) を検出することによって、炎症性疾患の発症の有無、あるいは炎症性疾患の発症の可能性を判定する方法である。

上記の特定遺伝子とは、ヒト染色体6p21上の約130kbの領域に存在するリンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子 (配列番号6)、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子 (配列番号7)、及びBAT1遺伝子 (配列番号8) より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子であって、遺伝子多型は、これらの遺伝子を含むゲノムDNAのエキソン、イントロン、プロモーター部分に存在する。

本発明において「リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する遺伝子多型 (一塩基多型など) を検出する」とは、(i) 当該遺伝子多型 (遺伝子側多型と称する) を直接検出すること、及び(ii) 前記遺伝子

の相補配列側に存在する遺伝子多型（相補側多型と称する）を検出し、その検出結果から遺伝子側多型を推定することの双方を指すものとする。ただし、遺伝子側の塩基と相補配列側の塩基とが完全に相補的な関係にあるとは限らないという理由から、遺伝子側多型を直接検出することがより好ましい。

なお、本発明において検出対象となる相補側多型としては、リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子の相補配列、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子の相補配列、及びBAT1 遺伝子の相補配列から選ばれる少なくとも一つの相補配列に存在する遺伝子多型が挙げられ、より具体的には、下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型が挙げられる。

をいう。

(1) LT- $\alpha$  遺伝子の相補配列における、配列番号1に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基に相補的な塩基のC/Tの多型

(2) LT- $\alpha$  遺伝子の相補配列における、配列番号2に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基に相補的な塩基のT/Cの多型

(3) LT- $\alpha$  遺伝子の相補配列における、配列番号3に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基に相補的な塩基のG/Tの多型

(4) IKBL 遺伝子の相補配列における、配列番号4に示すIKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基に相補的な塩基のA/Tの多型

(5) BAT1 遺伝子の相補配列における、配列番号5に示すBAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基に相補的な塩基のC/Gの多型

本明細書において、遺伝子（例えばLT- $\alpha$  遺伝子）におけるX番目の塩基をその位置を示す数字Xと、塩基を表す記号との組み合わせで示す場合がある。例えば、「10G」とは、10番目の位置にあるGを示し、「10A」とは、10番目の位置にあるAを示し、「10G/A」とは、10番目の位置にあるG又はAを示す。

本明細書において配列番号2に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基は、LT- $\alpha$  遺伝子のエキソン1の1番目から数えて252番目

の塩基に相当する。また、配列番号3に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基は、LT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の1番目の塩基から数えて723番目の塩基に相当する。

従って、本明細書において配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるG/A多型は、LT- $\alpha$ イントロン1 252G/Aと、また配列番号3に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型は、LT- $\alpha$ エキソン3 723C/Aと表現する場合がある。

本明細書において配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基は、634番目の塩基を1番とした場合に下流方向に向かって63番目（-63番目）の塩基に相当する。また、配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基は、1250番目の塩基を1番とした場合に下流方向に向かって23番目（-23番目）に相当する。

従って、本明細書において配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型は、IKBLプロモーター-63T/Aと、また配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型は、BAT1プロモーター-23G/Cと表現する場合がある。

例えば、後記表1に示すように、配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基がGである場合（LT- $\alpha$ エキソン1 10G）、配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基がAである場合（LT- $\alpha$ イントロン1 252A）、配列番号3に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基がCである場合（LT- $\alpha$ エキソン3 723C）、配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基がAである場合（IKBLプロモーター-63A）、配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基がGである場合（BAT1プロモーター-23G）は、炎症性疾患が発症してい

る、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

これに対し、配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基がAである場合(LT- $\alpha$ エキソン1 10A)、配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基がGである場合(LT- $\alpha$ イントロン1 252G)、配列番号3に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基がAである場合(LT- $\alpha$ エキソン3 723A)、配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基がTである場合(IKBLプロモーター -63T)、配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基がCである場合(BAT1プロモーター -23C)は、炎症性疾患が発症していない、あるいは発症の可能性が低いと判定できる。

また、配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基と配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基(エキソン1の1番目の塩基から数えて252番の塩基)の組み合わせの違い(10G-252Aヘテロ接合、10A-252Gヘテロ接合、10A-252Aホモ接合)によってLT- $\alpha$ 発現量が異なる。従って、配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基と配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基の組み合わせが、10G-252Aヘテロ接合、10A-252Gヘテロ接合、10A-252Aホモ接合であるかを検出することによっても、炎症性疾患の判定ができる。

例えば後記実施例に示すように、10A-252Gである場合は炎症のシグナルであるLT- $\alpha$ の発現量が有意に多く、炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

また、配列番号3に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型は、エキソン3中の26番目のコドンが変化(ACCからAAC)することによってスレオニンからアスパラギンへのアミノ酸変異をもたらす。例えば後記実施例に示すように、26番目のコドンがアスパラギンをコ

ードする場合（26N）は、スレオニンをコードする場合（26T）より有意にLT- $\alpha$ の発現量が多く、またヒト冠状動脈平滑筋細胞（HCASMC）において細胞接着因子である血管細胞接着分子-1（VCAM-1）やE-セ렉チンを誘導することから炎症性疾患が発症している、あるいは発症の可能性が高いと判定できる。

本明細書において、疾患の「判定」とは疾患発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断（罹患危険性の予想）、疾患の遺伝的要因の解明などをいう。

また、疾患の「判定」は、上記の一塩基多型の検出法による結果と、所望により他の多型分析（VNTRやRFLP）及び／又は他の検査結果と合わせて行うこともできる。

また、本明細書において、「炎症性疾患」とは、炎症性病態との相関が知られている細胞接着因子やサイトカインの誘導が認められる疾患であれば特に限定はされないが、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性腸炎、種々のアレルギー反応、細菌性ショック、心筋梗塞や脳卒中などの動脈硬化性疾患などが挙げられ、特には心筋梗塞が挙げられる。

#### （検出対象）

遺伝子多型の検出の対象は、ゲノムDNAが好ましいが、場合によっては（つまり多型部位及びその隣接領域の配列がゲノムと同一または完全相補的になっている場合）cDNA、又はmRNAを使用することもできる。また、上記対象を採取する試料としては、任意の生物学的試料、例えば血液、骨髓液、精液、腹腔液、尿等の体液；肝臓等の組織細胞；毛髪等の体毛等が挙げられる。ゲノムDNA等は、これらの試料より常法に従い抽出、精製し、調製することができる。

#### （増幅）

遺伝子多型を検出するにあたっては、まず遺伝子多型を含む部分を増幅する。増幅は、例えばPCR法によって行われるが、他の公知の増幅方法、例えばNASBA法、LCR法、SDA法、LAMP法等で行ってもよい。

プライマーの選択は、例えば、配列番号1から5に示される配列における、前

記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基、より好ましくは10～50塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅するように行う。

プライマーは、前記の一塩基多型部位を含む所定塩基数の配列を増幅するためのプライマーとして機能し得る限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでいてもよい。

増幅のために用いるプライマーは、試料が一の対立遺伝子型の場合にのみ増幅されるようにフォワードプライマー又はリバースプライマーの一方が一塩基多型部位にハイブリダイズするように選択してもよい。プライマーは必要に応じて蛍光物質や放射性物質等により標識することができる。

#### (遺伝子多型の検出)

遺伝子多型の検出は、一の対立遺伝子型に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションにより行うことができる。プローブは、必要に応じて、蛍光物質や放射性物質等の適当な手段により標識してもよい。プローブは、前記の一塩基多型部位を含み、被検試料とハイブリダイズし、採用する検出条件下に検出可能な程度の特異性を与えるものである限り何等限定はない。プローブとしては、例えば配列番号1から5に示す配列における、前記の一塩基多型部位を含む連続する少なくとも10塩基以上、好ましくは10～100塩基の配列、より好ましくは10～50塩基の配列、又はそれらの相補配列にハイブリダイズすることのできるオリゴヌクレオチドを用いることができる。また、一塩基多型部位がプローブのほぼ中心部に存在するようにオリゴヌクレオチドを選択するのが好ましい。該オリゴヌクレオチドは、プローブとして機能し得る限り、即ち、目的の対立遺伝子型の配列とハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の配列とはハイブリダイズしない条件下でハイブリダイズする限り、その配列において1又はそれ以上の置換、欠失、付加を含んでいてもよい。また、プローブには、RCA (rolling circle amplification) 法による増幅に用いられる一本鎖プローブ(パドロックプローブ)のように、ゲノムDNAとアニールし、環状になることによって上記のプローブ

の条件を満たすプローブが含まれる。

本発明に用いるハイブリダイゼーション条件は、対立遺伝子型を区別するのに十分な条件である。例えば、試料が一の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズするが、他の対立遺伝子型の場合にはハイブリダイズしないような条件、例えばストリンジেন্টな条件である。ここで、「ストリンジেন্টな条件」としては、例えば、例えば、モレキュラークロニング・ア・ラボラトリーマニュアル第2版 (Sambrook et al., 1989) に記載の条件等が挙げられる。具体的には、例えば、 $6 \times \text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC}$  の組成:  $0.15 \text{ M NaCl}$ 、 $0.015 \text{ M}$  クエン酸ナトリウム、 $\text{pH } 7.0$ )、 $0.5\% \text{ SDS}$ 、 $5 \times$  デンハート及び  $100 \text{ mg/ml}$  ニシン精子DNAを含む溶液中プローブとともに  $65^\circ\text{C}$  で一晩保温するという条件等が挙げられる。

プローブは、一端を基板に固定してDNAチップとして用いることもできる。この場合、DNAチップには、一の対立遺伝子型に対応するプローブのみが固定されていても、両方の対立遺伝子型に対応するプローブが固定されていてもよい。

遺伝子多型の検出は、制限酵素断片長多型分析法 (RFLP: Restriction fragment length polymorphism) により行うこともできる。この方法では、一塩基多型部位がいずれの遺伝子型をとるかによって制限酵素により切断されるか否かが異なってくる制限酵素で試料核酸を消化し、消化物の断片の大きさを調べることにより、該制限酵素で試料核酸が切断されたか否かを調べ、それによって試料の多型を分析する。

遺伝子多型の検出は、増幅産物を直接配列決定することによって行ってもよい (ダイレクトシーケンシング法)。配列決定は、例えばジデオキシ法、Maxam-Gilbert 法等の公知の方法により行うことができる。

遺伝子多型の検出は、インベーターアッセイにより行ってもよい。この方法では、SNP があるかどうかテストする DNA ターゲットフラグメントに対して相補的配列を持つインベーターオリゴと  $5'$  のフラップ構造を持ち、SNP を検出するための相補的オリゴ (シグナルプローブ) を使用する。まずターゲット DNA に対し



てインベーターオリゴとシグナルプローブをハイブリダイズさせる。この時、インベーターオリゴとプローブは1塩基がオーバーラップする構造(invasive structure)を持つ。この部分に Cleavase (Archaeoglobus fulgidus から分離されたフラップ・エンドヌクレアーゼ) が作用し、SNP 部位のシグナルプローブの塩基とターゲットの塩基が相補的 (SNP なし) の場合にはシグナルプローブの5' フリップが切断される。切断された5' フリップは FRET Probe (Fluorescence resonance energy transfer probe) にハイブリダイズする。FRET プローブ上には蛍光色素とクエンチャー(Quencher)が近接しており、蛍光が抑制されるが、5' フリップDNAが結合することにより Cleavase によって蛍光色素の部分が切断され、蛍光シグナルが検出できる。

遺伝子多型の検出はまた、変性勾配ゲル電気泳動法 (D G G E : denaturing gradient gel electrophoresis)、一本鎖コンフォメーション多型解析 (S S C P : single strand conformation polymorphism)、対立遺伝子特異的 P C R (allele-specific PCR)、A S O (allele-specific oligonucleotide) によるハイブリダイゼーション法、ミスマッチ部位の化学的切断 (C C M : chemical cleavage of mismatches)、H E T (heteroduplex method) 法、P E X (primer extension) 法、R C A (rolling circle amplification) 法等を用いることができる。

## [2] 炎症性疾患診断用キット

前記のプライマー又はプローブとしてのオリゴヌクレオチドは、これを含む炎症疾患診断用キットとして提供できる、キットは、上記遺伝子多型の分析法に使用される制限酵素、ポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸、標識、緩衝液等を含んでいてもよい。

## [3] L T- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の発現状態の分析方法

本発明によればまた、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することによって、L T- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T

1の発現状態を分析することができる。

例えば、配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基がAで、配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基（エキソン1の1番目の塩基から数えて252番の塩基）がGである場合（10A-252Gハプロタイプ）は、LT- $\alpha$ の発現量が多いと判断できる。これに対し、配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基がGで、配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基（エキソン1の1番目の塩基から数えて252番の塩基）がAである場合（10G-252Aハプロタイプ）、配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基がAで、配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基（エキソン1の1番目の塩基から数えて252番の塩基）がAである場合（10A-252Aハプロタイプ）は、LT- $\alpha$ の発現量が少ないと判断できる。

#### [4] LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性の測定方法

本発明によればまた、前記の（1）から（5）よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによってLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性を測定することができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、一塩基多型がプロモーター部位に存在する場合は、その一塩基多型を含む遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を培養し、レポーター活性を測定すれば、一塩基多型による転写効率に違いを測定することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコール、

アセチルトランスフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどの遺伝子が用いられる。

[5] LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性阻害物質のスクリーニング方法

本発明においては、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片を細胞に導入し、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することによってLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1転写活性阻害物質をスクリーニングすることができる。

本発明の好ましい態様によれば、前記LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する。

例えば、LT- $\alpha$ の発現量が有意に高いことが認められる一塩基多型(例えば上記10A-252Gハプロタイプ)を有する遺伝子の下流にレポーター遺伝子を挿入した系を導入した細胞を候補物質の存在下又は非存在下の両方の場合について培養し、候補物質の存在下で培養を行った場合にレポーター活性が下がれば、その候補物質はLT- $\alpha$ 転写活性阻害物質として選択することができる。

ここでリポーター遺伝子としては、上記に挙げた遺伝子が用いられる。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、個々の低分子合成化合物でもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、あるいは化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリー、コンビナトリアルライブラリーでもよい。候補物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーが好ましい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

上記のスクリーニング法により得られるLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性阻害物質もまた本発明の範囲内である。このようなLT- $\alpha$ 、IKBL、又

はBAT1の転写活性阻害物質は、心筋梗塞治療剤、抗炎症剤、免疫抑制剤などの各種薬剤の候補物質として有用である。

#### [6] LT- $\alpha$ 転写制御因子のスクリーニング方法

本発明においてはまた、前記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することによって、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子をスクリーニングすることができる。前記の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される物質との結合の検出は、ゲルシフト法（電気泳動移動度シフト解析： electrophoretic mobility shift assay, EMSA）、DNase I フットプリント法等によって行うことができるが、ゲルシフト法が好ましい。ゲルシフト法では、タンパク質（転写制御因子）が結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動におけるDNAの移動度が低下するので、 $^{32}\text{P}$ で標識した遺伝子断片と転写制御因子を混ぜ、ゲル電気泳動にかける。オートラジオグラフィーでDNAの位置を見ると、因子の結合したDNAはゆっくり動くので、通常バンドよりも遅れて移動するバンドとして検出される。

#### [7] 炎症性疾患の治療方法及び炎症性疾患の治療薬

本発明においては、以下の実施例5で示す通り、LT- $\alpha$ タンパク質の動脈壁隆起性病変部での発現状態を調べた結果、心筋梗塞患者由来の動脈壁隆起性病変部内血管平滑筋細胞およびマクロファージにおいてLT- $\alpha$ タンパク質が強く染色されており、病変の発生、進展に関連している可能性が示唆された。従って、LT- $\alpha$ タンパク質の発現や活性を抑制すれば病変の改善、再発又は予防が期待できる。

さらに、心筋梗塞感受性遺伝子産物であるLT- $\alpha$ の26Asn変異体は、野生型(26Thr)に比べて血管平滑筋細胞からの接着分子（VCAM-1, E-selectin）の誘導

能が強いことが知られている (Ozaki k. et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002)。本発明では、以下の実施例 6 で示す通り、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) および血球系細胞株 (HL-60) における  $LT-\alpha$  変異体 (26Asn) のサイトカイン誘導活性及び接着分子誘導活性について、26Thr の活性と比較した。その結果、図 5 及び 6 に示したように、 $LT-\alpha$  (Asn26) は  $LT-\alpha$  (Thr26) に比べて血管内皮細胞からの Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF)、selectin-E mRNA を 2 倍高く、HL-60 細胞からは TNF, ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1) mRNA を 3 倍高く誘導した。これらの結果は、 $LT-\alpha$  (26Asn) が心筋梗塞等の炎症性疾患の発症、進展に関与していることを示していると共に、 $LT-\alpha$  の活性を抑制することによる心筋梗塞等の炎症性疾患の治療が期待できる。また、 $LT-\alpha$  の活性を抑制するための手段としては、例えば、リンホトキシン- $\alpha$  ( $LT-\alpha$ ) に対する抗体を用いることができる。

また、リンホトキシン- $\alpha$  ( $LT-\alpha$ ) の発現又は活性を抑制する物質を有効成分として含む、炎症性疾患の治療薬も本発明の範囲内に含まれる。ここで用いるリンホトキシン- $\alpha$  ( $LT-\alpha$ ) の発現又は活性を抑制する物質としては、リンホトキシン- $\alpha$  に対する抗体が挙げられる。また、リンホトキシン- $\alpha$  に対する抗体としては、ヒト抗体又はヒト化抗体を使用することもできる。

リンホトキシン- $\alpha$  に対する抗体は、定法により作製することができる。例えば、リンホトキシン- $\alpha$  に対するポリクローナル抗体は、リンホトキシン- $\alpha$  を抗原として哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等) を当業者に公知の方法で免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。抗原を投与する際には、適当なアジュバントを使用することもできる。血液からの抗体の分離・精製は、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の通常の方法によって行うことができる。

リンホトキシン- $\alpha$ に対するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを用いて作製することができる。リンホトキシン- $\alpha$ に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、抗体産生細胞（免疫動物から採取した脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等）とミエローマ細胞（例えば、マウスでは、P 3 X 6 3 A g 8、P 3 U 1 株、S p 2 / 0 株など）とをポリエチレングリコール又はセンダイウイルスなどの融合促進剤を用いて細胞融合させることにより作製することができる。細胞融合後のハイブリドーマの選抜にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT）培地を常法に従って使用することができる。得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。

#### 〔8〕炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法

上記の通り、本発明では、炎症性疾患では、リンホトキシン- $\alpha$ の発現又は活性の亢進が関与していることが示されたことにより、リンホトキシン- $\alpha$ の発現又は活性を低下させる物質は、炎症性疾患の治療薬として有用であることが判明した。本発明によればさらに、リンホトキシン- $\alpha$ の発現又は活性を低下させる物質をスクリーニングする方法が提供される。上記スクリーニングの一例としては、細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内におけるリンホトキシン- $\alpha$ （LT- $\alpha$ ）をコードする遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程により行うことができる。また、上記スクリーニングの別の例としては、リンホトキシン- $\alpha$ （LT- $\alpha$ ）と候補物質とを接触させる工程、リンホトキシン- $\alpha$ の活性を測定する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較してリンホトキシン- $\alpha$ の活性を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程により行うことができる。ここで言うリンホトキシン- $\alpha$ の活性とは、例えば、接着分子及び／又はサイトカインを誘導する活性であり、接着分子の具体例

としては、VCAM-1、ICAM-1又はE-セレクトリンであり、サイトカインの具体例としてはTNFである。

候補物質としては任意の物質を使用することができる。候補物質の種類は特に限定されず、例えば、本明細書中上記〔5〕に記載した各種のライブラリー等を使用することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

### 実施例 1（関連性研究）

#### （1）方法

##### ①被験者

一般に、心筋梗塞の診断には、次に挙げる3つの基準のうち2つを必要とする：  
（1）胸の圧迫、痛み、又は締め付けが30分以上継続する臨床歴、（2）少なくとも一の標準又は二の胸部誘導において0.1mVより大きいST-セグメント上昇、（3）通常の実験値の2倍よりも大きい血清クレアチンキナーゼ濃度における上昇。これらの基準によって心筋梗塞と診断された患者1,133名を被験者とした。心筋梗塞患者の被験者の年齢範囲は28～85才で、平均年齢は62.5才であった。一方、幾つかの医療機関を通じて志願した健常者1,006名を対照とした。対照の被験者の年齢範囲は5才から88才で、平均年齢は38.5才であった。なお、すべての被験者は日本人であった。

##### ②SNP発見及びゲノタイピング

全ゲノム関連性研究のために、ウェブサイト (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>) 上で利用できるSNPデータベースを用いた。SNPsのスクリーニングは既報 (Iida, A., et al., J. Hum. Genet., 46, 668-683, 2001) に従って行った。LT- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、LST1、1C7、アログラフト炎症因子-1 (allograft inflammatory-factor-1 (AIF-1))、I kappa B-like protein (IKBL)、

V-ATPase G-subunit like protein(ATP6G)、BAT1、MICB及びp5-1を含む約130kbの6p21上の関連領域(図1、上パネル)をスクリーニングした。スクリーニングに先立って、GeneBankデータベースからの配列Y14768、AP000506及びAC004184をアセンブリングすることによって約130kbの参照配列を作成した。PCRプライマーデザイン、PCR実験、DNA抽出、DNA配列及びSNP発見のためのプロトコルはIida, A., et al., J. Hum. Genet., 46, 668-683, 2001に記載に従った。130kb領域におけるSNPsはインベーターアッセイ又はPCR産物のダイレクトシーケンスによってcapillary sequencer (ABI3700、Applied Biosystems)を用いて既報(Ohnishi, Y., et al., J. Hum. Genet., 46, 471-477, 2001; Iida, A., et al., J. Hum. Genet., 46, 668-683, 2001)に従って行った。

本実施例で使用したプライマー及びプローブを以下に記載する。

(1) LT- $\alpha$  (インベーター法によりタイピング)

PCR プライマー

フォワードプライマー: ACTCAGCCAAGGGTGCAGAG (配列番号9)

リバースプライマー: CTCCTCAGGGATTGAGACCTC (配列番号10)

プローブ (括弧内は SNP)

Exon 1 10G>A

TCCAAAGCACGAAGCACGGGCAGCCCAAGGAGATGGGGCAGGAGAGCCTCACCTGCTGTG[CT]GGAGCCCC  
TGGGCCCCGACGCTCAGGTCCCTTTATAGAGGAAGCGGCAGTGGCAGCGTGG (配列番号11及び12)

Intron 1 90A>G

AGAGAAACCCCAAGGTGAGCAGAGGGAGACAGAGAGAGACAGGAAGGGAACAGAGAGGAA[TC]CATGGCAG  
AAACAGAGAATGTGTGACAGAGACAATGAGACTGACAGATGGAGAGTCAGAG (配列番号13及び14)

Exon 3 81C>A

TCACACCTTCAGCTGCCAGACTGCCCGTCAGCACCCCAAGATGCATCTTGCCACAGCA[CA]CCTCAAAC



CTGCTGCTCACCTCATTGGTAAACATCCACCTGACCTCCCAGACATGTCCCC (配列番号 15 及び 16)

(2) I K B L (シーケンス法によりタイピング)

PCR プライマー

フォワードプライマー : TTTAAGGCTCAGGAGCCCAG (配列番号 17)

リバースプライマー : TCCCTGTTGTTGTCCCACTG (配列番号 18)

シーケンスプライマー : ATATCATGTACCCGGCAGAC (配列番号 19)

(3) B A T 1 (インベーター法によりタイピング)

PCR プライマー

フォワードプライマー : TGGTCTCACATCACTGTTACGC (配列番号 20)

リバースプライマー : TCTTCCCGCTCGGATTCAG (配列番号 21)

プローブ :

AAGCTTACCTAAACAGGGAGAGCGCGTATGGCGGCAGCAACAGCGACGAAGGAGGGAAAT[GC]TGCCTTCACTCCGGTTGCAGGCTTCCCTCTACTCCAGCCTCCCGCCTTCTTGGCTGCAA (配列番号 22 及び 23)

③統計学的分析

関連性研究のための統計学的分析、ハプロタイプ頻度及び Hardy-Weinberg 平衡、及び LD 係数 ( $D'$ ) の計算は既報 (Yamada, R., et al., Am. J. Hum. Genet., 68, 674-485, 2001) に従って行った。

(2) 実験結果

関連性研究の第 1 のステップとして、ハイスループットマルチプレックス PCR-インベーターアッセイ法 (Ohnishi, Y., et al., J. Hum. Genet., 46, 471-477, 2001) を用いて 94 名の心筋梗塞患者をゲノタイピングし、その結果を健常人集団に見出されるアレル頻度と比較した。約 75,000 の遺伝子をベースとした SNPs のスクリーニングの結果、染色体 6 p 21 上の  $LT-\alpha$  遺伝子内にあるひとつの SNP (イントロン 1 ; 252 A > G) の心筋梗塞に対する弱い関連性を同定することができた ( $\chi^2=9.4$ ,  $p=0.0022$  ; マイナーアレルに対するホモ接合体対

その他)。続いて全部で 1,133 名の心筋梗塞患者と 1,006 の対照者をゲノタイピングした結果、 $\chi^2$  値が 18.0 ( $p=0.000022$ ; マイナーアレルに対するホモ接合体対その他) 及びオッズ比が 1.69 (95%コンフィデンスインターバル (CI); 1.32-2.15、表 1) となり、その関連性はずっと顕著になった。これらのデータは、心筋梗塞感受性遺伝子がこの領域内に存在することを示した。

LD マッピングのための高密度 SNP マップを 16 名の心筋梗塞患者と 16 名の対照者からの DNA のダイレクトシーケンシングによって構築した。TNF- $\alpha$ 、LT- $\beta$ 、I kappa B-like protein (IKBL)、及び BAT1 (図 1、上パネル) に関連する分子をコードするいくつかの他の分子を含んでいる約 130 キロベースの 6 p 21 上の関連領域をスクリーニングした。該領域に全部で 187 個の SNPs を同定し、そして 94 名の心筋梗塞患者と一般的な集団からの 94 名の対照を 120 個のそれらのマーカーに対してゲノタイピングし、エレクトロフェログラム上でヌクレオチドシグナルのピークレベルを比較することによって大まかに推定された約 10% 以上のアレル頻度に基づいて選択した。最終的に、疾患関連性遺伝子と決定するに十分に高いアレル頻度を有する 26 SNPs が (>25%、マイナーアレル)、p5-1 及び AIF-1 の近くに D' drop off を伴う強い LD の広がりのある一つのブロックを示した (図 1、下パネル)。よって心筋梗塞感受性遺伝子がこれらの 2 つの遺伝子座の間に位置すると結論し、試料サイズを拡大することによってこれらの 26 個の SNPs をタイピングした。それらのほとんどは心筋梗塞表現型との顕著な関連性は示さなかったが、これらの 26 個の SNPs のうちの 4 個は心筋梗塞患者と対照との間でマイナーアレルに対するホモ接合性の頻度を比較したとき、心筋梗塞との強い関連性を表した (表 1)。これらの SNPs は LT- $\alpha$  のエクソン 1 内の 10 G>A 及びエクソン 3 内の 723 C>A (Thr26Asn)、IKBL のプロモーター領域内の -63 T>A、及び BAT1 のプロモーター領域内の -23 G>C であった。4 つの全てはほとんど完全に互いに連鎖しており、その領域内の特定のハプロタイプはそれぞれの SNP 単独よりも心筋梗塞との関連性に対してより高い統計学的有意差を示した。各 SNP に

対するゲノタイプの分布に関する Hardy-Weinberg 平衡は、患者群と対照群両方に対する  $\chi^2$  試験によって評価し、顕著な偏差を示さなかった ( $p > 0.01$ )。これらの SNP 遺伝子座はほとんど同じ程度の心筋梗塞との関連性を有しているので、LT- $\alpha$ 、IKBL 及び BAT1 のすべてが心筋梗塞感受性に影響を及ぼす候補と考えることができた。

表 1 :

LT- $\alpha$ 、IKBL、及びBAT1における心筋梗塞とSNPsの関連性				
ゲノタイプ	心筋梗塞 (N=1,133)	対照 (N=1,006)	$\chi^2$ [p value]	OR (95%CI)
LT- $\alpha$ exon1 10G>A				
GG	416(36.7%)	378(37.6%)		
GA	504(44.5%)	512(50.9%)	AA vs. GG+GA	1.78
AA	213(18.8%)	116(11.5%)	21.6 [0.0000033]	(1.39-2.27)
LT- $\alpha$ intron1 252A>G				
AA	413(36.5%)	371(36.9%)		
AG	511(45.1%)	516(51.3%)	GG vs. AA+AG	1.69
GG	209(18.4%)	119(11.8%)	18.0 [0.000022]	(1.32-2.15)
LT- $\alpha$ exon3 723C>A, T26N				
CC	414(36.5%)	374(37.2%)		
CA	506(44.7%)	516(51.3%)	AA vs. CC+CA	1.78
AA	213(18.8%)	116(11.5%)	21.6 [0.0000033]	(1.39-2.27)
IKBL promoter -63T>A				
TT	406(35.8%)	374(37.2%)		
TA	521(46.0%)	509(50.6%)	AA vs. TT+TA	1.6
AA	206(18.2%)	123(12.2%)	14.5 [0.000129]	(1.25-2.03)
BAT1 promoter -23G>C				
GG	411(36.3%)	374(37.2%)		
GC	517(45.6%)	510(50.7%)	CC vs. GG+GC	1.6
CC	205(18.1%)	122(12.1%)	14.7 [0.000129]	(1.26-2.04)

実施例2 (LT- $\alpha$ のイントロン1内のSNPによってもたらされる転写活性の増加)

### (1) 実験方法

LT- $\alpha$ の-307から268まで、IKBLの-635から15まで、及びBAT1の-1231から30までに対応するDNA断片を、ゲノムDNAを鋳型として用いてPCRによって増幅し、pGL3-basic vector (Promega)に5' - 3' 方向にクローニングした。Jurkut細胞 (RIKEN Cell Bank から入手; RCB0806) は10%ウシ胎児血清を添加したPRMI1640培地内で成長させた。LT- $\alpha$ 遺伝子における2つのSNPs、エキソン1内の10G>A及びイントロン1内の252A>Gがその発現レベルに影響を与えるかどうかを決定するために、両方のSNPs (それぞれ10G-252A, 10A-252G及び10A-252Aハプロタイプ) を含むゲノム断片をルシフェラーゼ遺伝子転写ユニットの上流に含む3種のプラスミドを構築した。

上記 Jurkut 細胞 ( $2 \times 10^6$ ) に、10ug の上記プラスミド構築物と 2.5ug の pRL-TK ベクター (トランスフェクション効率のための内部制御) を LipoTAXI トランスフェクション試薬 (Stratagene) を用いてトランスフェクトした。6 時間後、細胞を PMA (20ng/ml) 及びイソノミシン (1uM) (Sigma) で刺激した。24 時間後、細胞を集め、ルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

また、IKBL及びBAT1遺伝子のプロモーター領域におけるSNPsの転写効率に与える影響を同様にして調べた。

### (2) 実験結果

図2Aに示すように、10A-252Gハプロタイプを含むクローンは他の2つのハプロタイプを含むクローンよりも1.5倍の転写活性を示し、エキソンにおける一つの置換ではなく、イントロン1における置換がLT- $\alpha$  遺伝子の転写に影響を与えることを示した。すなわち、心筋梗塞に強い関連性を示すLT- $\alpha$  遺伝子におけるこれら2つのSNPsはその発現レベルに影響を与えることがわか

った。

一方、同じく心筋梗塞と顕著な関連性を示す I K B L ( - 6 3 T > A ) のプロモーター領域における S N P は転写活性の適度な減少が認められた(図 2 B)。I K B L は I k B ファミリーのメンバーで、N F kappa B ( N F - κ B ) / r e l p o t e i n のような転写因子に対する阻害分子である (Albertella, M.R., et al., Hum. Mol. Genet., 3, 793-799, 1994)。L T - α プロモーター領域における D N A 配列は N F - κ B, S P - 1 及び A P - 1 / c - f o s / j u n を含む数種の核因子に対する結合モチーフを含むという事実から判断すると (Messer, G. et al., J. Exp. Med., 173, 209-219, 1991)、I K B L はこれらの核因子の阻害を通じて L T - α の転写を制御すると考えられる。

### 実施例 3 ( L T - α のイントロン 1 に対する未知の核因子の結合)

#### (1) 実験方法

Jurkat 細胞からの核抽出物が 2 5 2 A 又は 2 5 2 G アレルを含むゲノム配列に対応するオリゴヌクレオチドに結合できるかどうかを調べた。Andrews, N. C. et al., Nucleic, Acid Res., 11, 2499, 1991 に記載したように、Jurkat 細胞から調製した核抽出物をジオキシゲニン (DIG) - 11 - ddUTP にて標識した 33bp のオリゴヌクレオチドと DIG - gel shift kit (Roche) を用いてインキュベートした。競合研究のために、未標識のオリゴヌクレオチド (100 倍過剰) を DIG - 標識オリゴヌクレオチドの添加前に核抽出物と前培養した。タンパク質 / D N A 複合体を 0.5 × Tris / ホウ酸 / EDTA (TBE) 緩衝液中、未変性 7 % ポリアクリルアミドゲル上で分離した。ゲルをニトロセルロース膜に移し、シグナルの検出を化学発光検出システム (Roche) を用いて製造者の指示に従って行った。

#### (2) 実験結果

図 3 に示すように、G アレルに対応するオリゴヌクレオチドを用いたとき現れるバンドは A アレルに対応するバンドよりも強く、これは Jurkat 細胞に存在する幾つかの核因子が A アレルに対するよりも G アレルに対してより強固に結合した

ことを示す。実験は3回行い同様な結果を得た。この結果はこの領域に結合することによってLT- $\alpha$ の転写を制御する一つ又はそれ以上の核抽出物における未同定の分子が心筋梗塞に関連しているかもしれないことを示す。

#### 実施例4 (LT- $\alpha$ タンパク質内のT26N変異による接着分子の誘導)

##### (1) 実験方法

LT- $\alpha$ 産物は、その炎症プロセスへの寄与のように、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、及び種々の白血球から接着分子及びサイトカインを誘導することができる((Ross, R., N. Engl. J. Med., 340, 115-126, 1999; Ware, C.F., et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 198, 175-218, 1995)。これらの生物学的活性が遺伝子産物におけるアミノ酸置換によって影響されるかどうかを調べた。コドン26におけるSNPはスレオニンからアスパラギンへのアミノ酸変化をもたらす。従って、各アレル(26N-LT- $\alpha$ は26T-LT- $\alpha$ )について接着分子及びサイトカインの発現を誘導する能力を培養したヒト冠状動脈血管内皮細胞(HCAEC)及びヒト冠状動脈平滑筋細胞(HCASM C)を用いて次のようにして調べた。

まず、精製した大腸菌由来組み換え体26N-LT- $\alpha$ 及び26T-LT- $\alpha$ をpET43 system (Novagen)を用いて調製した。HCAEC及びHCASM C (BioWhittaker, Inc.)を5ng/mlのLT- $\alpha$ タンパク質(26N-LT- $\alpha$ 又は26T-LT- $\alpha$ )で4時間処理した。全RNAをトリゾール(Life Technologies)を用いて単離した。cDNAを2 $\mu$ gの全RNAからdT15プライミングによって調製し、SuperScript 逆転写酵素(Life Technologies)を用いて合成した。mRNAをQuantiTect SYBR Green PCR kit(QIAGEN)及びABI Prism 7700 sequence detector (Applied Biosystems)を用いて定量した。各試験は3回繰り返えし、各試料は三重に試験した。

##### (2) 実験結果

変異タンパクである26N-LT- $\alpha$ は26T-LT- $\alpha$ よりもHCASM C

において血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) 及びE-セレクチンmRNAについて2倍高い転写活性レベルを示した(図4)。

#### 実施例5 (LT- $\alpha$ タンパク質の動脈壁隆起性病変部での発現状態)

##### (1) 実験方法

動脈壁隆起性病変部位のパラフィン包埋切片をシランコーティングスライド上に貼り付け、キシレンを用いて脱パラフィン操作を行った。その後、マイクロウェーブにより抗原性を賦活し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために3%過酸化水素水/エタノールで15分処理し、非特異的反応を抑えるために5%スキムミルク液でブロッキング反応を行った。5  $\mu$ g/mlの抗LT- $\alpha$ 抗体(R & D社)を用いて、40℃、一晚反応し、洗浄後、2次抗体(rabbit ENVISION Polymer Reagent; DAKO社)を加え、室温で1時間反応した。ペルオキシダーゼ基質を用いて発色後、顕微鏡下でLT- $\alpha$ タンパク質のシグナルを観察した。ネガティブコントロールとして、非免疫正常ヒツジIgG(DAKO社)を用いて同様に染色した。

##### (2) 実験結果

上記の免疫染色の結果、心筋梗塞患者由来、動脈壁隆起性病変部内血管平滑筋細胞およびマクロファージにおいてLT- $\alpha$ タンパク質が強く染色されることが確認された。この結果より、LT- $\alpha$ タンパク質が病変の発生、進展に関連している可能性が示唆された。

#### 実施例6 (LT- $\alpha$ 変異体(Asn26)による血管内皮細胞、血球系細胞株からのサイトカイン、接着分子の誘導)

##### (1) 実験方法

冠動脈血管内皮細胞(Bio Whittaker社)は血管内皮細胞専用培地(Bio Whittaker社)、HL-60(RIKEN cell BANK)はRPMI-1640培地(SIGMA社)で培養した。LT- $\alpha$ タンパク質の作製、サイトカイン、接着分子mRNAの誘導の評価は既報(Ozaki k. et al. Nature Genetics 32, 650-654, 2002)に従って行っ



た。

## (2) 実験結果

ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC) および血球系細胞株 (HL-60) での LT- $\alpha$  (26Asn) のサイトカイン、接着分子誘導活性について、LT- $\alpha$  (26Thr) の場合と比較した。結果を図 5 及び図 6 に示す。図 5 及び図 6 に示した通り、LT- $\alpha$  (Asn26) は LT- $\alpha$  (Thr26) に比べて血管内皮細胞からの Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF)、selectin-E mRNA を 2 倍高く、HL-60 細胞からは TNF、ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule-1) mRNA を 3 倍高く誘導した。これらの結果から、LT- $\alpha$  (26Asn) が心筋梗塞等の炎症性疾患の発症、進展に関与していることを示された。

## 産業上の利用の可能性

本発明の方法によれば、心筋梗塞を初めとする炎症性疾患の発症の有無の判断、疾患発症の可能性の判断を正確にかつ迅速に行うことができる。

## 請求の範囲

1. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

2. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) 遺伝子、I Kappa B-like (IKBL) 遺伝子、及びBAT1 遺伝子より成る群から選ばれる少なくとも1つの遺伝子に存在する少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

3. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

(1) 配列番号1に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL 遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号5に示すBAT1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型

4. 配列番号1に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン1の塩基配列の10番目の塩基と配列番号2に示すLT- $\alpha$  遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基の組み合わせが、G-Aヘテロ接合体であるか、A-Gヘテロ接合体であるか、A-Aホモ接合体であるかを検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

5. 配列番号3に示すLT- $\alpha$  遺伝子のエキソン3の塩基配列の80番目から

8 2 番目の塩基の少なくとも一つが他の塩基に置換されることによって、コードされるアミノ酸がスレオニンからアスパラギンに変異する遺伝子多型を検出することを含む、炎症性疾患の判定方法。

6. 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

7. 配列番号 1 から 5 に示される配列における、下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、又はその相補配列にハイブリダイズすることができ、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法においてプローブとして用いるオリゴヌクレオチド。

(1) 配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位

(2) 配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の部位

(3) 配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の部位

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の部位

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の部位

8. 配列番号 1 から 5 に示される配列における、下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも 1 つの部位を含む連続する少なくとも 10 塩基の配列、及び／又はその相補配列を増幅することができ、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法においてプライマーとして用いるオリゴヌクレオチド。

(1) 配列番号 1 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 1 の塩基配列の 10 番目の部位

(2) 配列番号 2 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の部位

(3) 配列番号 3 に示す L T- $\alpha$  遺伝子のエキソン 3 の塩基配列の 81 番目の部

位

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の部位

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の部位

9. プライマーがフォワードプライマー及び/又はリバースプライマーである請求項8に記載のオリゴヌクレオチド。

10. 請求項7から9のいずれかに記載のオリゴヌクレチドの1種以上を含む、炎症性疾患診断用キット。

11. 炎症性疾患が心筋梗塞である請求項10に記載のキット。

12. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を検出することを含む、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の発現状態の分析方法。

(1) 配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエクソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエクソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型

13. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含むLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片を細胞に導入し、該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写活性の測定方法。

(1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエクソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエクソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

14. 下記の (1) から (5) よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 遺伝子断片を細胞に導入し、LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性を阻害する候補物質の存在下で該細胞を培養し、該遺伝子の発現を分析することを含む、LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性阻害物質のスクリーニング方法。

(1) 配列番号 1 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエクソン 1 の塩基配列の 10 番目の塩基における G/A の多型

(2) 配列番号 2 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のイントロン 1 の塩基配列の 90 番目の塩基における A/G の多型

(3) 配列番号 3 に示す LT- $\alpha$  遺伝子のエクソン 3 の塩基配列の 81 番目の塩基における C/A の多型

(4) 配列番号 4 に示す I K B L 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 572 番目の塩基における T/A の多型

(5) 配列番号 5 に示す B A T 1 遺伝子のプロモーターの塩基配列の 1228 番目の塩基における G/C の多型

15. 請求項 14 に記載のスクリーニング方法により得られる LT- $\alpha$ 、I K B L、又は B A T 1 の転写活性阻害物質。

16. 前記LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1遺伝子断片の下流にリポーター遺伝子を結合させた転写ユニットを細胞に導入し、該細胞を培養し、リポーター活性を測定することによって該遺伝子の発現を分析する、請求項13又は14に記載の方法。

17. 前記リポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項16に記載の方法。

18. 下記の(1)から(5)よりなる群から選ばれる少なくとも一種の一塩基多型を含む遺伝子断片とLT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子の存在が予想される試料を接触させ、上記断片と転写制御因子との結合を検出することを含む、LT- $\alpha$ 、IKBL、又はBAT1の転写制御因子のスクリーニング方法。

(1) 配列番号1に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエクソン1の塩基配列の10番目の塩基におけるG/Aの多型

(2) 配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるA/Gの多型

(3) 配列番号3に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のエクソン3の塩基配列の81番目の塩基におけるC/Aの多型

(4) 配列番号4に示すIKBL遺伝子のプロモーターの塩基配列の572番目の塩基におけるT/Aの多型

(5) 配列番号5に示すBAT1遺伝子のプロモーターの塩基配列の1228番目の塩基におけるG/Cの多型

19. 検出がゲルシフトアッセイにより行われる請求項18に記載の方法。

20. 配列番号2に示すLT- $\alpha$ 遺伝子のイントロン1の塩基配列の90番目の塩基におけるC/Aの多型を含む遺伝子断片を接着分子誘導性細胞に導入し、該細胞の接着分子の誘導化能を評価する方法。

21. 前記細胞がヒト冠状動脈平滑筋細胞(HCASM C)である請求項20に記載の方法。

22. 前記接着分子が血管細胞接着分子-1 (VCAM-1) 又はE-セレクチンである請求項20に記載の方法。

23. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) の発現又は活性を抑制することを含む、炎症性疾患の治療方法。

24. 炎症性疾患が心筋梗塞である、請求項23に記載の方法。

25. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) に対する抗体を用いる、請求項23又は24に記載の方法。

26. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) の発現又は活性を抑制する物質を有効成分として含む、炎症性疾患の治療薬。

27. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) の発現又は活性を抑制する物質が、リンホトキシン- $\alpha$  に対する抗体である、請求項26に記載の治療薬。

28. 細胞と候補物質とを接触させる工程、細胞内におけるリンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) をコードする遺伝子の発現量を分析する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較して当該遺伝子の発現量を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

29. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) と候補物質とを接触させる工程、リンホトキシン- $\alpha$  の活性を測定する工程、及び候補物質の非存在下の条件と比較してリンホトキシン- $\alpha$  の活性を低下させる候補物質を炎症性疾患の治療薬として選択する工程を含む、炎症性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

30. リンホトキシン- $\alpha$  の活性が、接着分子及び／又はサイトカインを誘導する活性である、請求項29に記載の方法。

31. 接着分子が、VCAM-1、ICAM-1 又はE-セレクチンであり、サイトカインがTNFである、請求項30に記載の方法。

32. リンホトキシン- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) の発現量又は活性の低下が、IKBL遺伝子の発現量又は活性の増加を介したものである、請求項28又は29に記載の方法。

図 1

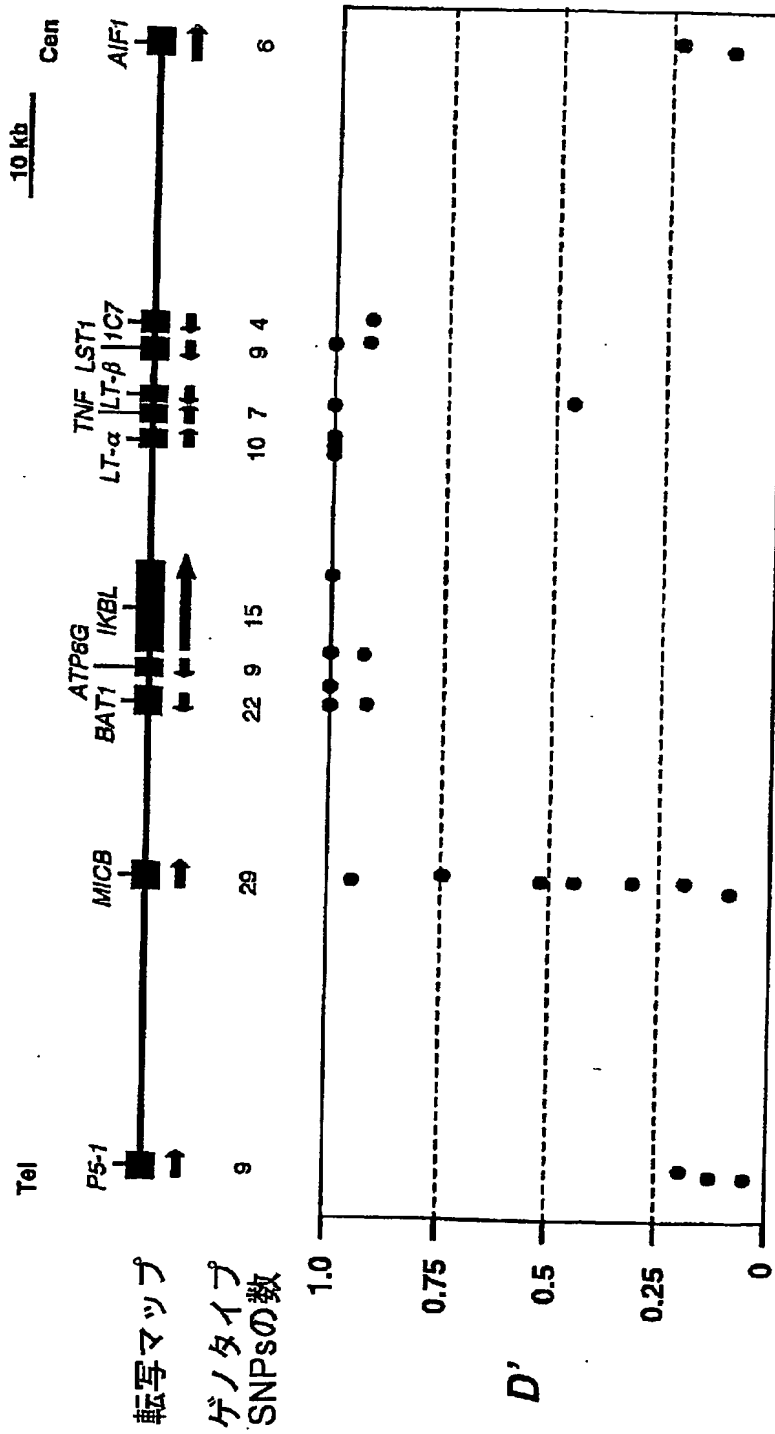
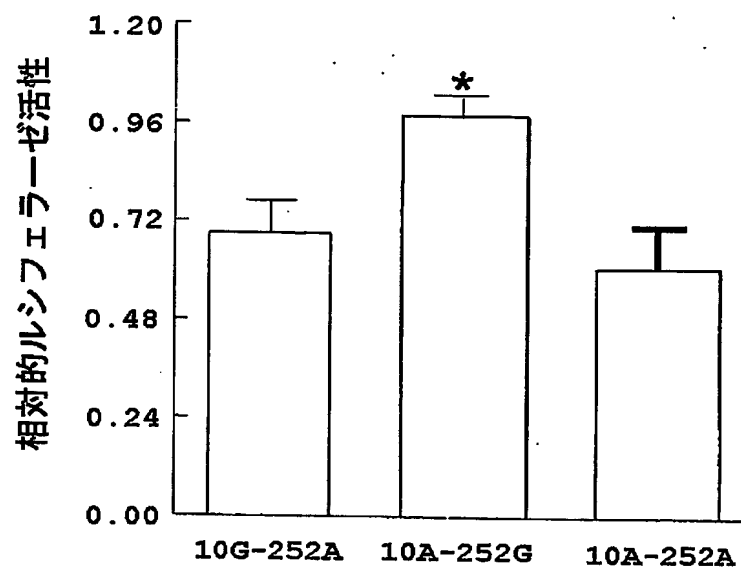




図 2

A



B

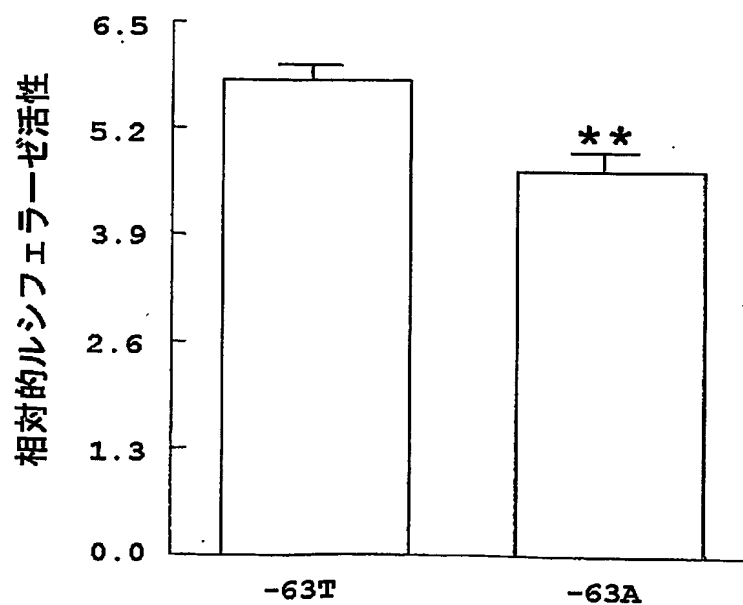


図 3

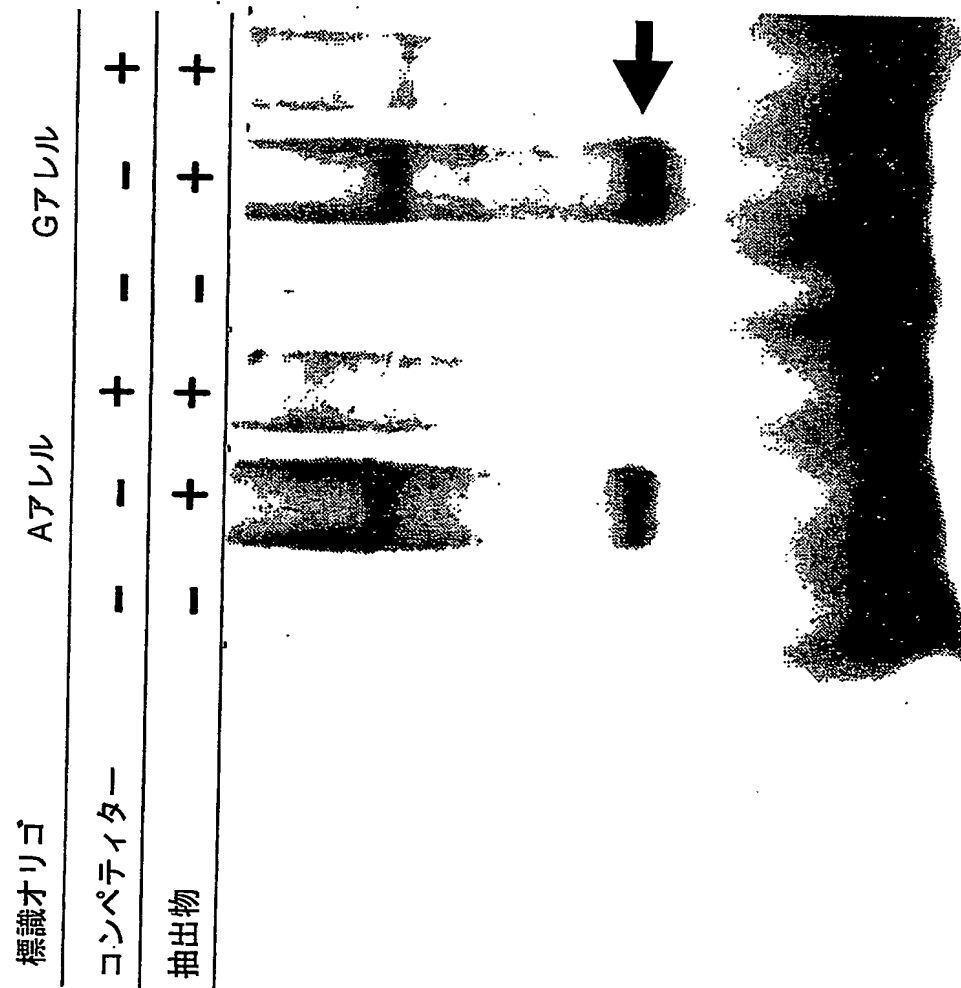
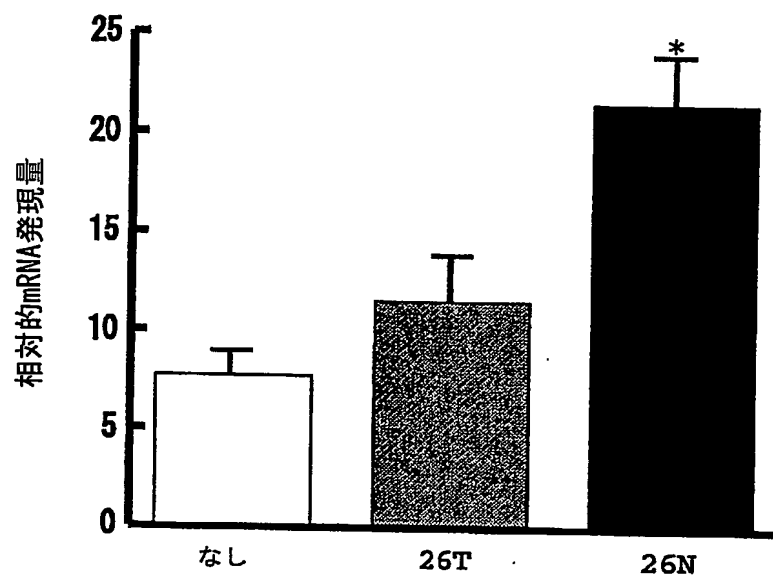


図 4

A



B

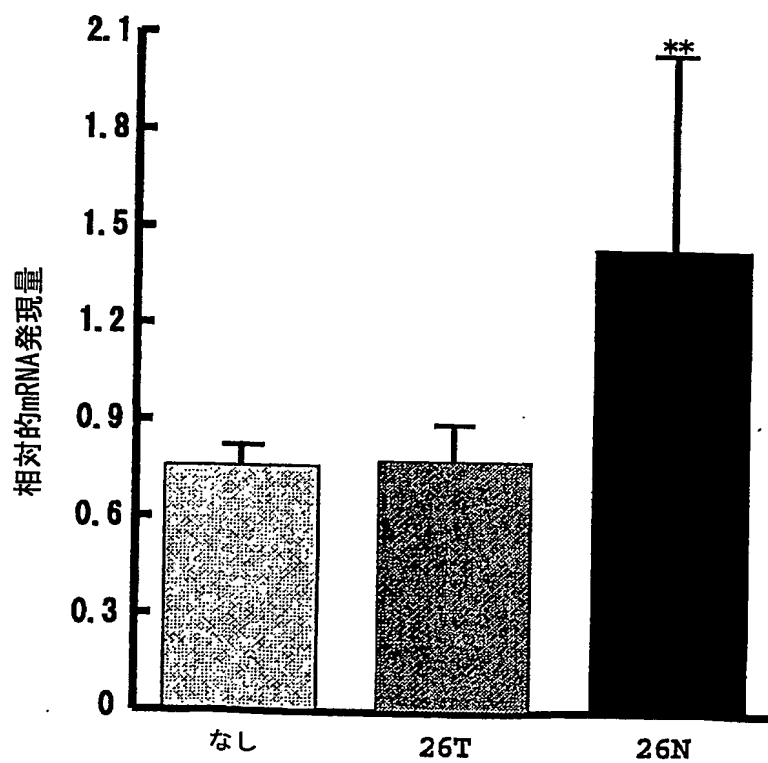


図 5

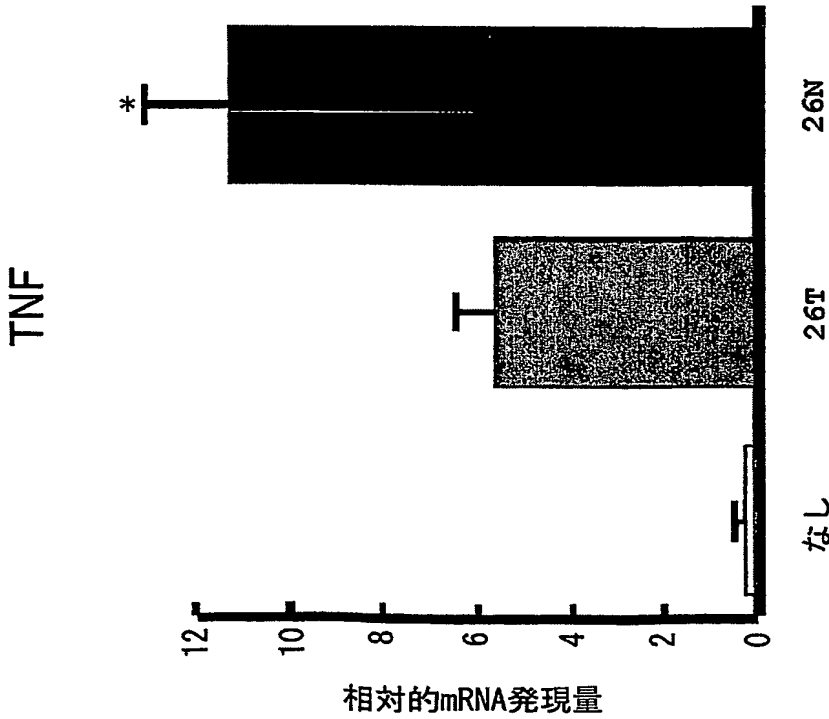
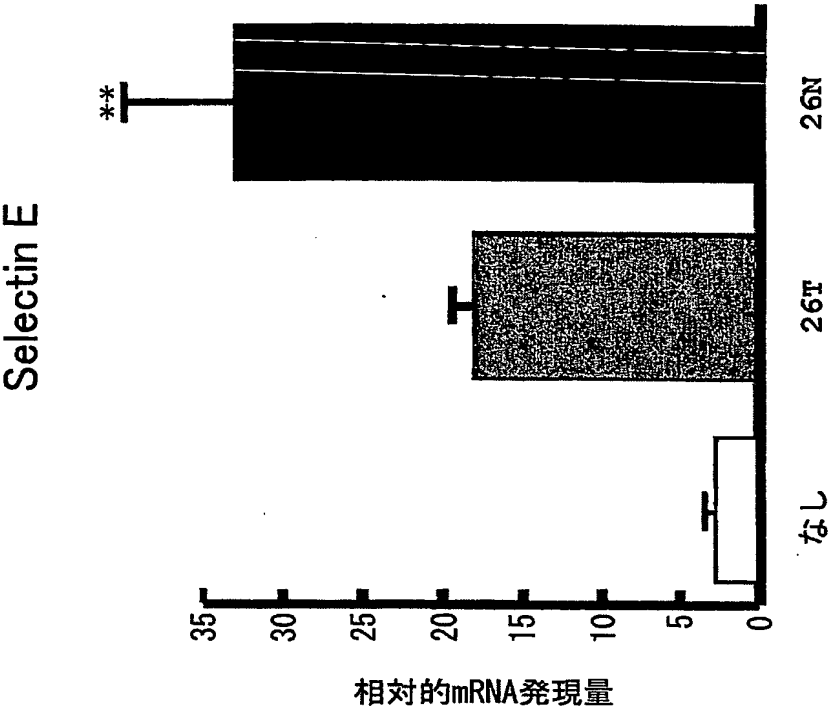
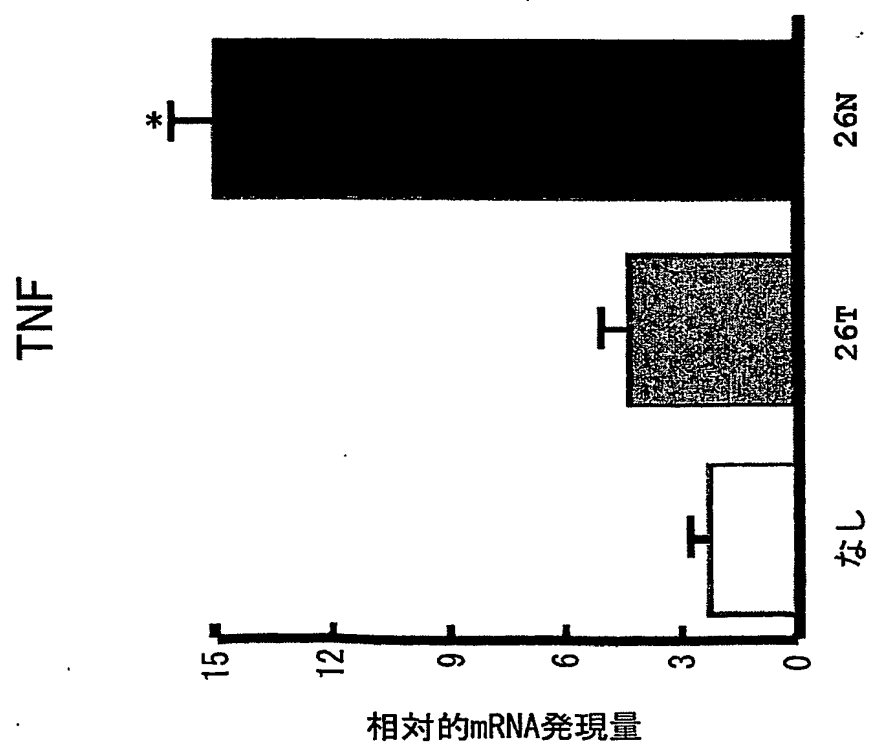
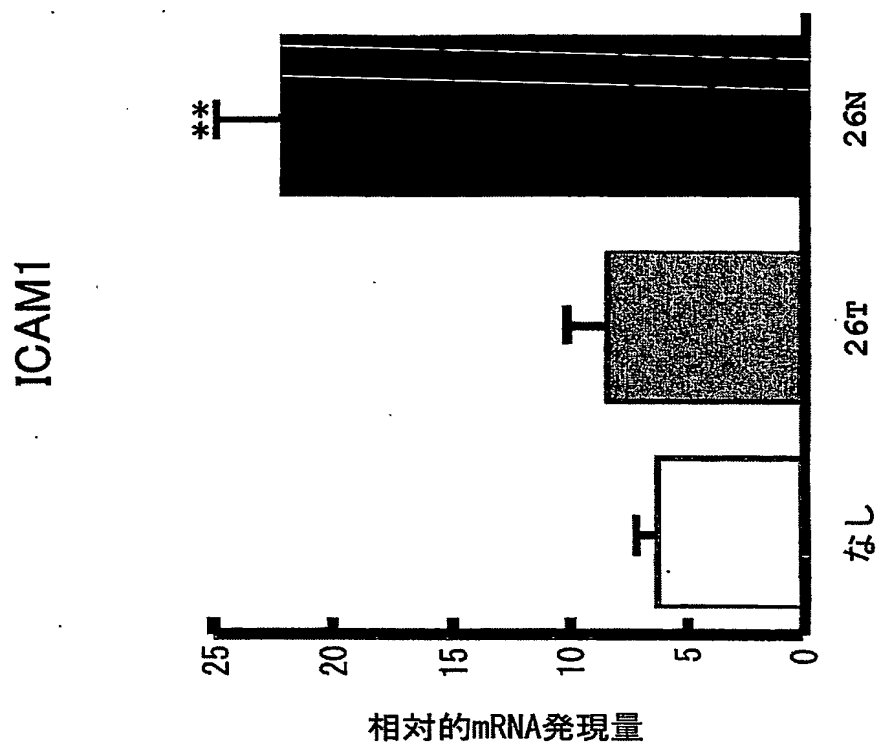


図 6



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; RIKEN et al.

&lt;120&gt; Method for judging inflammatory diseases

&lt;130&gt; A31454A

&lt;160&gt; 23

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 162

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```
aggggctccg cacagcaggt gaggtctctc tgcccatct ccttgggctg cccgtgcttc 60
gtgctttgga ctaccgccca gcagtgtcct gccctctgcc tgggcctcgg tccctcctgc 120
acctgctgcc tggatccccg gcctgcctgg gcctgggcct tg                               162
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 287

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

```
gtgggtttgg ttttggtttc cttctctgtc tctgactctc catctgtcag tctcattgtc 60
tctgtcacac attctctgtt tctgccatga ttctctctg ttccttctct gtctctctct 120
gtctccctct gctaccttg gggtttctct gactgcatct tgtccccttc tctgtcgatc 180
tctctctcgg gggtcggggg gtgctctctc ccaggcgagg aggtctgtct tccgccgcgt 240
gccccgcccc gctcactgtc tctctctctc tctctctttc tctgcag                               287
```

&lt;210&gt; 3

<211> 107

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggggctccct ggtgttgcc tcacaccttc agctgccag actgccgctc agcaccctaa 60  
gatgcattctt gccacagca cctcaaacc tgctgctcac ctcatg 107

<210> 4

<211> 634

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

caacctgtgt tgggaaaaga gcattctggg cttaattcta aactaactct ctacctttct 60  
ctctctctcc accatccgc cccctcccct gcctcccgtt gtaacatct ccatcttttt 120  
ctacatattt ctcaagtcca aatttttgca tctcattgc cccatcctac gatagtcttc 180  
ttcgtctttt tgtctgtatt tttctttttt tttgatctgt cctgtttgtt gtcccactgt 240  
ggtttttggt tttgttttcc atgtttaatg tgatttttat cctgtcttta tctcctctat 300  
tttctctgtc ttctcatctt ttctgtccatc actgaaccat ctctctctc tgccaagtta 360  
gaggaggcgg gaaaaaacct ccaaataact ctcttttctc cctcccctcc cctgcctcc 420  
tttctctgc ctccagtcca gtcttctggt ttcagacggc ccctttaatt taagttccct 480  
agtttccctt gggagatctg gccagaact acccggtcgg ggcggaacga catccggtaa 540  
cgccccctac agttcattc cgtctctcac ctggtctct gcttgcgcca tttctctcag 600  
cctggagtgt ctccgccctt cccgcctccc gtct 634

<210> 5

<211> 1250

<212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

tgagatatgt tgctttgctt cgcttctgtc aataagatga gaataacggt acctactcct 60  
tagtattaaa tgattaagta tgtaacagg gagagggcca aacgtttggt gttttattac 120  
acagcaggac atcaggtctt actttttag ctccccatct caaagacggg gatagcaaatt 180  
gtttcattca ggaaaaaat ccaggttgaa caatggggct gttggggcgg ggccaagaac 240  
attctgctcg aattaacagt attaatgggc cgggcgcggt ggctcacgcc tgtaatccca 300  
gcactctggg aggccgaagt gggtagatca cctgaggtca tacatgggtg aagccccgtc 360  
tctactaaaa aaacaaaaat ttgctgggcg tggtggcggg cgctgtaat cctagctact 420  
cgggaggctg aggcaggaga atcgcttgaa cccgggaagc agcggttgca gtgagccgag 480  
atcaggacat tgcaactccg cctgggcgac agggcgagac tctgtctcaa aacaaaaaca 540  
aaaacagtat taatggaatg tagtataacc ctcaagccct actattaaca cttggggccg 600  
aatccagacc ccgtcttccc gctcggttc agaacacctt cctgactcac tggccctagg 660  
gcatcagcta cctcggacag catccttttg ggaaaatacc gccaccagc cccacgactg 720  
ggaaagagtc gggaaacacc cccgagcaat ccagttccct gagacttccc tcctccctcc 780  
cctcagctag ggctgccgg ttcttagtgc gtgccagca gtctcaggt caccttcaact 840  
accgggcca ggaccccggt ggaactcgca gccttcgcca cactcgttcc tcgcgcatcc 900  
atggaggggt gcctacagag aagacctgct tggcaaaaac ctaaacgaag agatgagggg 960  
catggagagg agtaggataa gagaataaag ataacagtgg gggggagacg ttagtttcct 1020  
ttatatcttt tgttactggc ggtagcagtg aagttagaaa cggttttaaa acaaatttca 1080  
gacaggcatt ttccaaaggc aagcctggag cgcacggatc tgtataaccg cggaaggccc 1140  
tgtttccggt cccttgcgcc tgcgtcttg cagccaagaa ggcgggaggc tggagtagag 1200  
ggaagcctgc aaccggaagt gaaggcagat ttccctcctt cgtcgtgtt 1250

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1386

&lt;212&gt; DNA



&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

gccccatctc cttgggctgc ccgtgcttcg tgctttggac taccgcccag cagtgtcctg 60  
ccctctgcct gggcctcggc ccctcctgca cctgctgcct ggatccccgg cctgcctggg 120  
cctgggcctt ggttctcccc atgacaccac ctgaacgtct cttcctccca aggggtgtgtg 180  
gcaccaccct acacctcctc cttctggggc tgctgctggc tctgctgcct ggggcccagg 240  
ggctccctgg tgttggcctc acaccttcag ctgccagac tgcccgtcag caccccaaga 300  
tgcatcttgc ccacagcacc ctcaaacctg ctgctcacct cattggagac ccagcaagc 360  
agaactcact gctctggaga gcaaacacgg accgtgcctt cctccaggat ggtttctcct 420  
tgagcaacaa ttctctcctg gtccccacca gtggcatcta cttcgtctac tcccagggtg 480  
tcttctctgg gaaagcctac tctcccaagg ccacctcctc cccactctac ctggcccatg 540  
aggtccagct cttctcctcc cagtaccctt tccatgtgcc tctcctcagc tcccagaaga 600  
tggtgtatcc agggctgcag gaaccctggc tgcaactgat gtaccacggg gctgcgttcc 660  
agctcaccca gggagaccag ctatccacc acacagatgg catccccac ctagtcctca 720  
gccctagtag tgtcttcttt ggagccttcg ctctgtagaa cttggaaaaa tccagaaaga 780  
aaaaataatt gatttcaaga ctttctcccc attctgcctc cattctgacc atttcagggg 840  
tcgtcaccac ctctcctttg gccattccaa cagctcaagt cttccctgat caagtcaccg 900  
gagctttcaa agaaggaatt ctaggcatcc caggggacca cacctccctg aaccatccct 960  
gatgtctgtc tggctgagga tttcaagcct gcctaggaat tcccagcca aagctgttgg 1020  
tctgtccac cagctaggtg gggcctagat ccacacacag aggaagagca ggcacatgga 1080  
ggagcttggg ggatgactag aggcaggag gggactatct atgaaggcaa aaaaattaaa 1140  
ttattttatt atggaggatg gagagagggg aataatagaa gaacatccaa ggagaaacag 1200  
agacaggccc aagagatgaa gagtgcgagc gcatgcgcac aaggctgacc aagagagaaa 1260  
gaagtaggca tgagggatca caggggccca gaaggcaggg aaaggctctg aaagccagct 1320  
gccgaccaga gcccacacg gaggcacatg caccctcgat gaagcccaat aaacctcttt 1380  
tctctg 1386

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1459

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

ccgagcttct taaacacagg ccttgggcta cggctctggg ggtacttggg ggggcggggg 60  
caggtctgat gagtaacccc tccccccagg ttccagagga agaagcctcc acatctgtct 120  
gccggcccaa gagttccatg gcctccactt cccgccgcca acgccgagaa cgtcgttttc 180  
gtcgttactt gtctgcagga cggctgggtcc gggcccaggc cctcctccag cgacaccag 240  
gcctcgatgt agatgctggg cagccccac cactgcaccg ggctgtgcc cgccacgatg 300  
cccctgccct gtgcctgctg cttcggctcg gggctgacc tgcaccag gaccgccatg 360  
gggacacggc actgcatgct gctgcccgc agggcccaga tgcctacacc gatttcttcc 420  
tcccgctgct aagccgctgt cctctgcca tgggaataaa gaataaggat ggggagacc 480  
ctggccaaat tttgggctgg ggacccccct gggattctgc tgaagaggag gaagaagatg 540  
atgcctcaa ggagcgggaa tggagacaga agctccaggg tgagctggag gacgagtggc 600  
aggaagtcac ggggaggttt gaaggtgatg cctcccatga aaccaggaa cctgagtcct 660  
tctcagcctg gtcagatcgc ctggcccggg aacatgcca gaagtgccag cagcagcagc 720  
gagaagcaga gggatcctgt cgacccccac gtgctgaggg ctccagccag agctggcgac 780  
acgaggagga ggagcagcgg ctcttcaggg agcgagcccg ggccaaggag gaagagctgc 840  
gtgagagccg agccaggagg gcgcaggagg ctctagggga ccgagaacc aagccaacca 900  
gggccggggc cagggaagag caccacagag gagcggggag gggcagcctc tggcgatttg 960  
gtgatgtgcc ctggccctgc cctgggggag gggaccaga ggccatggct gcagccctgg 1020  
tggccagggg ccccccttg gaggaacagg gggctctgag gaggtacttg agggctccagc 1080  
aggtccgctg gcaccctgac cgcttcctgc agcgattccg aagccagatt gagacctggg 1140  
agctgggccc tgtgatggga gcagtgcag ccttttctca ggccctgaat cgccatgcag 1200  
aggccctcaa gtgaccctag ggaagaagca agaaacttcg gggctgcagc ctcaggatga 1260  
ggcagaagga agggtaagg aaaggatggg gaccacaagg aagagccagg tgctgctcag 1320

cagaggatat ggggtgggagc gaaagttgta acaagtgggg gtgggggggtg cggggccgcca 1380  
ccactgctcc ttgactctgc cgtttcctaa taagacctgg ttccacatct caaaaaaaaaa 1440  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1459

<210> 8

<211> 1854

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

acaggcattt tccaaaggca agcctggagc gcacggatct gtataaccgc ggaaggccct 60  
gtttccggtc ccttgccgct gcgctcttgc agccaagaag gcgggaggct ggagtagagg 120  
gaagcctgca accggaagtg aaggcagatt tccctccttc gtcgctgttg ctgccgcat 180  
acgcgctctc cctgttttagc tcttctgtta gaaatagtat ctttgttttc ctttgctgtt 240  
cctcaatccc ctactcttca ccccttgttt tcacctattt tgcgagaacc catccagatc 300  
ccccttcctt tcttcccctg ccggcccagt tatggcagag aacgatgtgg acaatgagct 360  
cttggactat gaagatgatg aggtggagac agcagctggg ggagatgggg ctgaggcccc 420  
tgccaagaag gatgtcaagg gtcctatgt ctccatccac agctctggct ttcgtgactt 480  
cctgctcaag ccagagttgc tccgggcat tgtcgactgt ggctttgagc atccgtcaga 540  
agtccagcat gagtgcattc ctccaggcat tctgggaatg gatgtcctgt gccaggccaa 600  
gtcgggcatg ggaaagacag cagtgtttgt cttggccaca ctgcaacagc tggagccagt 660  
tactgggcag gtgtctgtgc tggatgatgt tcacactcgg gagttggctt ttcagatcag 720  
caaggaatat gagcgcttct ctaaatacat gccaatgtc aaggttgctg ttttttttgg 780  
tggtctgtct atcaagaagg atgaagaggt gctgaagaag aactgcccgc atatcgtcgt 840  
ggggactcca ggccgtatcc tagccctggc tcgaaataag agcctcaacc tcaaacacat 900  
taaacacttt attttgatg aatgtgataa gatgcttgaa cagctcgaca tgcgtcggga 960  
tgtccaggaa atttttcgca tgacccccca cgagaagcag gtcattgatgt tcagtgtac 1020  
cttgagcaaa gagatccgtc cagtctgccg caagttcatg caagatccaa tggagatcct 1080

cgtggatgat gagacgaagt tgacgctgca tgggttcag cagtactacg tgaaactgaa 1140  
ggacaacgag aagaaccgga agctctttga ccttctggat gtccttgagt tcaaccaggt 1200  
ggatgatcttt gtgaagtctg tgcagcgggtg cattgccttg gccagctac tagtgagca 1260  
gaacttccca gccattgcca tccaccgtgg gatgccccag gaggagaggc tttctcggta 1320  
tcagcagttt aaagattttc aacgacgaat tcttgtggct accaacctat ttggccgagg 1380  
catggacatc gagcgggtga acattgcttt taattatgac atgcctgagg attctgacac 1440  
ctacctgcat cgggtggcca gagcaggccg gtttggcacc aagggttggt ctatcacatt 1500  
tgtgtccgat gagaatgatg ccaagatcct caatgatgtg caggatcgct ttgaggtcaa 1560  
tattagttag ctgcctgatg agatagacat ctctctctac attgaacaga cacggtagaa 1620  
gactcgccca ttttggaatg tgaccgtctg tccttcagga gaggacacca ggggtgggggt 1680  
gaaggagaca ctactgcccc caccctgac agccccacc ccatggcttc catcttttgc 1740  
atcaccacca ctctgaacc cccatttctg attgtcaga attttttttt aacaaaacta 1800  
aaaatgaaac acatgtgtct gtggtatcta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1854

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

actcagccaa ggggtgcagag

20

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

cttcctcagg gattgagacc tc

22

<210> 11

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

tccaaagcac gaagcacggg cagcccaagg agatggggca ggagagcctc acctgctgtg 60  
cggagcccct gggcccggac gctcaggtcc ctttatagag gaagcggcag tggcagcgtg 120  
g 121

<210> 12

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

tccaaagcac gaagcacggg cagcccaagg agatggggca ggagagcctc acctgctgtg 60  
tggagcccct gggcccggac gctcaggtcc ctttatagag gaagcggcag tggcagcgtg 120  
g 121

<210> 13

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

agagaaaccc caaggtgagc agagggagac agagagagac aggaagggaa cagagaggaa 60  
tcatggcaga aacagagaat gtgtgacaga gacaatgaga ctgacagatg gagagtcaga 120  
g 121

<210> 14

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

agagaaaccc caaggtgagc agagggagac agagagagac aggaagggaa cagagaggaa 60  
ccatggcaga aacagagaat gtgtgacaga gacaatgaga ctgacagatg gagagtcaga 120  
g 121

<210> 15

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

tcacaccttc agctgcccag actgcccgtc agcaccccaa gatgcatctt gcccacagca 60  
ccctcaaacc tgctgctcac ctcatggta aacatccacc tgacctcca gacatgtccc 120  
c 121

<210> 16

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

tcacaccttc agctgcccag actgcccgtc agcaccccaa gatgcatctt gcccacagca 60  
acctcaaacc tgctgctcac ctcatggta aacatccacc tgacctcca gacatgtccc 120  
c 121

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

tttaaggctc aggagcccag 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

tccctgttgt tgtcccaactg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

atatcatgta cccggcagac

20

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

tggtctcaca tcactgttac gc

22

<210> 21



<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

tcttcccgct cggattcag

19

<210> 22

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

aagcttacct aaacagggag agcgcgtatg gcggcagcaa cagcgacgaa ggagggaaat 60  
gtgccttcac ttccggttgc aggcttcct ctactccage ctccgcctt cttggctgca 120  
a 121

<210> 23

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

aagcttacct aaacagggag agcgcgtatg gcggcagcaa cagcgacgaa ggagggaaat 60

ctgccttcac ttccggttgc aggttcctt ctactccagc ctcccgcctt cttggctgca 120

a

121

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JPO3/10131

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 15/12, 15/19, C12Q1/02, 1/66, 1/68, A61K45/00,  
39/395, A61P9/10, 29/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12Q1/00-1/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DDBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq,  
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Juliano C., Padovani et al., "Gene polymorphisms in the TNF Locus and the Risk of Myocardial Infarction", Thrombosis Research, 2000, Vol.100(4), pages 263 to 269, Full text	<u>8-9</u> 1-14, 16-22, 27-32
<u>X</u> Y	T. Keso et al., "Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men", Atherosclerosis, 2001, Vol.154(3), pages 691 to 697, Full text	<u>8-9</u> 1-14, 16-22, 27-32
<u>X</u> Y	Wener Koch et al., "Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery diseases and myocardial infarction", Atherosclerosis, 2001, Vol.159(1), pages 137 to 144, Full text	<u>8-9</u> 1-14, 16-22, 27-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 05 November, 2003 (05.11.03)	Date of mailing of the international search report 18 November, 2003 (18.11.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JPO8/10131

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Janardan P. Pandey., et al., "INF- $\alpha$ and TNF- $\beta$ Gene Polymorphisms in Systemic Sclerosis", Human Immunology, 1999, Vol.60, pages 1128 to 1130, Full text	<u>8-9</u> 1-5, 7-14, 16-22, 27-32
Y	Gerald Messer et al., "Polymorphic Structure of the Tumor Necrosis Factor (TNF) Locus: An NcoI Polymorphism in the First Intron of the Human TNF- $\beta$ Gene Correlates with A Variant Amino Acid in Position 26 and a Reduced Level of TNF- $\beta$ Production", The Journal of Experimental Medicine, 1991, Vol.173(1), p.209-219, Full text, particularly, Fig. 3	1-14, 16-22, 27-32
P, X	Kouichi OZAKI et al., "Functional SNPs in the lymphotoxin- $\alpha$ gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction", Nature Genetics, December, 2002, Vol.32, pages 650 to 654 Full text	1-14, 16-22, 27-32

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23-25

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 23 to 25 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 15, 26

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "a transcriptional activity inhibitor" as set forth in claim 15 and "a substance inhibiting expression or activity" as set forth in claim 26, it is completely unclear what compounds are involved therein and what are not, even though the statement in the (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Although the methods according to claim 1 are common to each other in the point "a method of judging an inflammatory disease which comprises detecting a gene polymorphism occurring in an about 130 kb region of 6p21", a method of judging an inflammatory disease by detecting a polymorphism on LT- $\alpha$  gene had been publicly known before the priority date of the present case (see, if necessary, Trombosis Research, 2000, Vol.100(4), p.263-269). Thus, the inventions according to claim 1 are not regarded as making a contribution over the prior art considered as a whole. Moreover, these inventions are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. The same applies to (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
The parts relating to claims 1 to 14, 16 to 22 and 27 to 32.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

description is taken into consideration. Thus, these claims are described in an extremely unclear manner. Such being the case, no meaningful search can be made on these claims.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

claims other than claim 1.

Such being the case, "a method of judging an inflammatory disease which comprises detecting a polymorphism in LT- $\alpha$  gene", "a method of judging an inflammatory disease which comprises detecting a polymorphism in IKBL gene" and "a method of judging an inflammatory disease which comprises detecting a polymorphism in BAT1 gene" are each regarded as relating to a single invention.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00, 15/12, 15/19, C12Q1/02, 1/66, 1/68, A61K45/00, 39/395, A61P9/10, 29/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, C12Q1/00-1/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DDBJ/SwissProt/PIR/GeneSeq  
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Juliano C. Padovani et al. "Gene Polymorphisms in the TNF Locus and the Risk of Myocardial Infarction" Thrombosis Research, 2000, Vol.100(4), p. 263-269, 文献全体参照	8-9 1-14, 16-22, 27-32
X Y	T. Keso et al. "Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men" Atherosclerosis, 2001, Vol.154(3), p. 691-697, 文献全体参照	8-9 1-14, 16-22, 27-32

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.11.03

国際調査報告の発送日

18.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

4N

9451

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
$\frac{X}{Y}$	Wener Koch et al. "Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery diseases and myocardial infarction" Atherosclerosis, 2001, Vol.159(1), p.137-144, 文献全体参照	8-9 1-14, 16-22, 27-32
$\frac{X}{Y}$	Janardan P. Pandey. et al. "TNF- $\alpha$ and TNF- $\beta$ Gene Polymorphisms in Systemic Sclerosis" Human Immunology, 1999, Vol. 60, p.1128-1130, 文献全体参照	8-9 1-5, 7-14, 16-22, 27-32
Y	Gerald Messer et al. "Polymorphic Structure of the Tumor Necrosis Factor (TNF) Locus: An NcoI Polymorphism in the First Intron of the Human TNF- $\beta$ Gene Correlates with A Variant Amino Acid in Position 26 and a Reduced Level of TNF- $\beta$ Production" The Journal of Experimental Medicine, 1991, Vol.173(1), p.209-219, 文献全体, 特にFigure.3参照	1-14, 16-22, 27-32
P, X	Kouichi Ozaki et al. "Functional SNPs in the lymphotoxin- $\alpha$ gene, that are associated with susceptibility to myocardial infraction" Nature Genetics, Dec. 2002, Vol. 32, p.650-654, 文献全体参照	1-14, 16-22, 27-32



## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 23-25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求項23-25は、治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 15, 26 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲15に記載の「転写活性阻害物質」及び請求の範囲26に記載の「発現又は活性を抑制する物質」について、明細書の記載を参酌しても、どのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1記載の方法は、「6p21上の約130kbの領域に存在する遺伝子の多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法」という点で共通しているものの、LT- $\alpha$  遺伝子の多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法は、本願優先日前に公知である (必要なら、Trombosis Research, 2000, Vol.100(4), p.263-269参照)。よって、請求の範囲1に係る発明は、全体として先行技術に対して行う貢献があるとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。請求の範囲1以外の請求項についても同様である。  
したがって、「LT- $\alpha$  遺伝子の多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法」、「IKBL遺伝子の多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法」及び「BAT1遺伝子の多型を検出することを含む炎症性疾患の判定方法」がそれぞれ1発明と認められる。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-14, 16-22, 27-32に関する部分

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。